Das Vorkommen und der Nachweis des Indicans in der Pflanze nebst Beobachtungen über ein neues Chromogen

von

Prof. Dr. **Hans Molisch** in Graz.

I. Einleitung.

Obwohl die Indigopflanzen in technischer Beziehung eine sehr wichtige Rolle spielen und das aus denselben gewonnene Indigblau Gegenstand zahlreicher chemischer Untersuchungen war, hat man von physiologischer Seite bisher noch nicht den Versuch gemacht, dem Auftreten des Indicans in der Pflanze nachzuspüren und dasselbe in der Zelle selbst nachzuweisen. Würde dafür eine sichere und einfache Methode aufgefunden werden, dann wäre es leicht, eine Vorstellung über die Vertheilung des genannten Glykosids innerhalb der Pflanze zu gewinnen und in einem gegebenen Falle rasch zu entscheiden, ob eine Pflanze Indican enthält oder nicht. Es wäre dann auch möglich, die Bedingungen zu erforschen, unter welchen sich das Indican in der Pflanzenzelle bildet und damit vielleicht auch Anhaltspunkte für eine möglichst ergiebige Indigoausbeute zu gewinnen.

Als ich im vorletzten Frühjahre, wie im letzten Capitel genauer berichtet werden soll, in der Schuppenwurz *Lathraea Squamaria* ein neues Chromogen auffand, welches unter der Einwirkung verdünnter Mineralsäuren einen blauen Farbstoff liefert, erwachte in mir das Bedürfniss nach einer derartigen Methode und bestimmte mich, nach einer solchen zu suchen.

II. Methodisches.

Auf Grund der bekannten Arbeiten von E. Schunck[1] wissen wir, dass der Waid *Isatis tinctoria* das Glykosid Indican enthält, aus welchem beim Erwärmen mit verdünnten Alkalien oder Säuren Indigblau und eine Zuckerart, Indiglucin, entstehen. Schunck hat auch ein genaues Verfahren angegeben, wie man aus getrockneten und gepulverten Blättern des Waids Indican schliesslich rein gewinnen kann. Hingegen hat bisher Niemand den Versuch gemacht, das Glykosid, beziehungsweise das Spaltungsproduct desselben, nämlich das Indigblau, direct in der Pflanze zur Anschauung zu bringen.

Makrochemischer Nachweis. Es war mir von Vorneherein nicht unwahrscheinlich, dass der Nachweis des Indicans in der frischen Pflanze durch Überführung desselben in Indigblau gelingen würde und dass dies durch Einwirkung von verdünnten Säuren, Ammoniakwasser und Alkalien in verdünntem Zustande gut zu bewerkstelligen sein dürfte.

Ich unterlasse es, die verschiedenen Vorversuche, die ich in dieser Richtung unternommen habe, zu schildern und theile gleich diejenige Methode mit, mit deren Hilfe es rasch und sicher gelingt, sich von der An- oder Abwesenheit des Indicans in der Pflanze zu überzeugen.

Wird ein Blattstück vom Waid, von *Phajus grandiflorus* oder *Calanthe veratrifolia* in der Eprouvette mit verdünntem Ammoniak (98 cm^3 Wasser und 2 cm^3 käufliches concentrirtes Ammoniak) etwa $^1/_2$ Minute gekocht, so färbt sich die Flüssigkeit beim Aufwallen gewöhnlich mehr oder minder blaugrün oder blau mit einem violetten Stich, falls Indican im Blatte zugegen war. Bei länger andauerndem Kochen wird diese Färbung nebenher auftretender Reactionen halber zumeist schwächer.

Das in der Flüssigkeit vertheilte und zum Theile durch einen gelben Farbstoff verdeckte Indigblau kann nach dem Filtriren über einen Platinconus und nach dem Abkühlen leicht mit wenig Chloroform ausgeschüttelt und die Empfindlichkeit der Reaction auf diese Weise bedeutend gesteigert werden.

---

[1] Jahresbericht über die Fortschritte der Chemie, 1855, 659 und 1858, 465.

Ganz ähnliche Ergebnisse erhält man, wenn die Pflanzentheile anstatt mit Ammoniak mit sehr verdünnter Kali- oder Natronlauge oder mit 1—2 procentiger Salz- oder Schwefelsäure etwa ½ Minute gekocht werden. Doch befriedigten mich die mit Ammoniak erhaltenen Resultate bei den drei oben genannten Pflanzen am meisten. Hiezu kommt noch, dass im Ammoniakwasser von obiger Concentration etwa vorhandenes Anthokyan sich vollständig verfärbt und weniger stört, während dasselbe in Säuren erst recht deutlich in Erscheinung tritt und von dem Ungeübten mit Indigblau verwechselt werden könnte. Selbstverständlich wird bei Gegenwart von Anthokyan nach der Ausschüttlung mit Chloroform jeder Zweifel schwinden, da ja Anthokyan in Chloroform unlöslich ist und daher in dasselbe nicht übergeht.

Das Gesagte gilt für die Mehrzahl der Indigopflanzen. Ich muss jedoch betonen, dass bei *Polygonum tinctorium*, dem Färbeknöterich, die Spaltung des Indicans zwar mit verdünnten Säuren, aber mit alkalischen Substanzen (Ammoniak, Kalilauge) nicht gelingt.[1]

Beim Kochen geht der grösste Theil des Indicans in Lösung und wird ausserhalb der Zellen in der Flüssigkeit unter Bildung von Indigblau, welches die Flüssigkeit oft deutlich blau färbt, gespalten, der andere in den Zellen zurückbleibende Theil des Indicans erleidet innerhalb dieser die Spaltung. Unter dem Mikroskop erscheinen derartige gekochte Blattfragmente an ihrer Oberfläche oder genauer gesagt an den Aussenflächen

---

[1] Ich halte diese Thatsache für sehr wichtig, weil sie dafür spricht, dass wir vorläufig nicht berechtigt sind, in allen Indigopflanzen ein und dasselbe Indican anzunehmen. Bekanntlich hat Schunck (l. c.) Indican nur aus *Isatis tinctoria* dargestellt. Es ist daher nicht gerechtfertigt, wie dies in der Literatur allgemein geschieht, dieses Glykosid ohneweiters allen Indigopflanzen zuzuschreiben. Der Umstand, dass bei gewissen Indigopflanzen die Spaltung des Indicans mit Alkalien gelingt, bei anderen nicht, erklärt sich in der einfachsten Weise durch die Annahme verschiedener Indicane, die aber unter sich grosse Verwandtschaft besitzen mögen. Ich erinnere daran, dass auch der Harnindigo ursprünglich auf Indican zurückgeführt wurde, bis genauere Untersuchungen gezeigt haben, dass die Muttersubstanz des Harnindigos nicht Indican, sondern das Alkalisalz der Indoxylschwefelsäure ($C_8H_7NSO_4$) ist. Siehe Hammarsten, Lehrbuch der physiolog. Chemie, 1891, S. 305.

der Epidermiszellen mit Indigblaukryställchen wie besäet, nicht selten derart, dass die Blätter im auffallenden Lichte in metallischer, kupferartiger Farbe erglänzen. Im Zellinhalte treten wenige oder gar keine Farbstoffkrystalle auf. Um den wahren Sachverhalt zu erkennen, ist eine sehr genaue Einstellung des Mikroskops nothwendig, denn bei flüchtiger Betrachtung wäre man vielleicht geneigt, die der Aussenfläche der Oberhautzellen aufsitzenden Kryställchen in das Innere der Zellen zu versetzen und die Epidermis als den Hauptsitz des Glykosids anzusehen. Dem ist aber nicht so. Die Kryställchen stammen aus der Flüssigkeit, in welcher sie sich in grosser Zahl abscheiden, und bleiben dann an der Blattoberfläche einfach liegen.

Mikrochemischer Nachweis (Alkoholprobe). Das mitgetheilte Verfahren kann trotz seiner Vorzüge selbstverständlich nicht zum mikrochemischen Nachweis des Indicans dienen, da ja das Indican zum grossen Theile aus den Geweben heraustritt und nicht an seinem ursprünglichen Orte gespalten wird. Das Letztere erreicht man aber, wie ich gefunden habe, in ausgezeichneter Weise, wenn man die zu prüfenden Pflanzentheile einige Zeit in Alkoholdampf liegen lässt.

Zu diesem Zwecke lege ich die Pflanzenobjecte in gut verschliessbare Glasdosen von verschiedenen Dimensionen (Krystallisationsschalen mit übergreifendem Deckel, wie sie auch für bacteriologische Untersuchungen verwendet werden). In dem Glasgefäss befindet sich ein Schälchen mit absolutem Alkohol, der verdunstet und in dem abgesperrten Raume rasch eine Alkoholatmosphäre erzeugt. Hier verweilen die Objecte gewöhnlich 24 Stunden. Dünne Pflanzentheile (Blätter) können auch kürzere Zeit darin belassen werden, dickere hingegen (Stengel, Scheinknollen von *Phajus* etc.) müssen, wenn sie nicht gehörig zerkleinert worden sind, mehr als einen Tag dem Alkoholdampf ausgesetzt bleiben. Falls mit dem längeren Verweilen in dem Alkoholdampf die Gefahr einer Austrocknung verknüpft sein sollte, kann man derselben passend dadurch vorbeugen, dass man die Innenseite des Glasgefässes mit nassem Filterpapier auskleidet.

Während des Verweilens der Pflanzentheile in der Alkoholatmosphäre erleidet das Indican in den Zellen eine Zerlegung,

was sich beispielsweise an den weissen Blüthen von *Calanthe* durch eine intensive Blaufärbung und an grünen Organen, z. B. an den Blättern von *Polygonum tinctorium*, *Calanthe*, *Phajus* und anderen, wegen des das Indigblau deckenden Chlorophyllfarbstoffes durch eine entsprechende Verfärbung zu erkennen gibt. Grüne Blätter und alle anderen chlorophyllführenden Organe lege ich, nach etwa 24stündigem Aufenthalt in Alkoholdampf, in absoluten Alkohol, um das Chlorophyll zu extrahiren. Sobald dasselbe weggeschafft ist, gibt sich die Vertheilung des Indigblaues (beziehungsweise des Indicans), besonders auf weisser Unterlage, durch eine mehr minder intensive Blaufärbung in höchst charakteristischer Weise zu erkennen.

Zum Zwecke der mikroskopischen Untersuchung bette ich Schnitte oder Bruchstücke von in der angegebenen Weise behandelten Pflanzenobjecten entweder direct oder noch besser nach dem Abspülen in reinem Wasser in Chloralhydrat (2 Theile Chloralhydrat auf 5 Theile Wasser) ein, worin die Gewebe sich schön aufhellen und das Vorkommen des Indigblaues mit aller nur wünschenswerthen Deutlichkeit erkennen lassen.

Diese Methode, die ich von nun an kurz als »Alkoholprobe« bezeichnen will, hat überdies den grossen Vortheil, dass man nach der Extraction des Chlorophylls gewöhnlich schon mit blossem Auge die Vertheilung des Indigblaues in den verschiedenen Organen oder in der ganzen Pflanze übersieht. So lässt ein nach dem oben angegebenen Verfahren behandelter blühender Zweig vom Färbeknöterich die Laubblätter abgesehen von der Mittelrippe und den Seitennerven tiefblau, die Ochrea, den Stengel und die Blüthen aber in ihrer natürlichen Farbe erscheinen.

Es leistet somit diese Methode für den Indican-Nachweis Analoges wie die sogenannte Sachs'sche Jodprobe für den Stärkenachweis.

Mikroskopisch gibt sich das Indigblau im Zellinhalt gewöhnlich in Form zahlreicher tiefblauer Körnchen oder Kryställchen zu erkennen, die bald zerstreut oder zu kleinen Häufchen angeordnet herumliegen. Es ist unlöslich in Wasser, Alkohol Äther, verdünnten Säuren und Alkalien. Hingegen fand ich die Körnchen und Krystalle löslich in heissem Anilin, in Phenol,

Chloroform und concentrirter Schwefelsäure. Sie stimmen demnach in ihren Löslichkeitsverhältnissen mit Indigblau überein.

Um Indigblau in den Zellen zur Abscheidung zu bringen, ist es gerade nicht nothwendig, dampfförmigen Alkohol zur Tödtung der Zellen anzuwenden, es gelingt dies gewöhnlich, wenn auch minder vollkommen, durch directes Eintauchen in flüssigen Alkohol (40%). Da aber Indican in Alkohol löslich ist, so wird Indican, wenn auch nur theilweise, herausdiffundiren und sich der Beobachtung entziehen. Bei der Einwirkung des Alkoholdampfes ist dies ausgeschlossen. Hier muss das Indican im Gewebe zurückbleiben. Allem Anscheine nach wird das Glykosid auch innerhalb der Zelle an Ort und Stelle gespalten, ohne nach der Abtödtung des Protoplasmas von Zelle zu Zelle zu diffundiren. Würde das Letztere eintreten, dann wäre es unbegreiflich, warum gewisse Elemente stets frei von Indigblau bleiben, daran grenzende aber solches constant führen.

Wie entsteht nun aus dem Indican innerhalb der Zelle das Indigblau?

Es lässt sich leicht zeigen, dass Indican führende Zellen beim Absterben Indigblau bilden. Werden Blätter von Indigopflanzen zerschnitten, zerrieben, gedrückt oder einfach eintrocknen gelassen, so erkennt man an den Wundstellen, oft auch an den eintrocknenden Blatttheilen deutliche Blaufärbung. Die Blätter des Waids, gewisser *Indigofera*-Arten, gewisser Indigo-Orchideen nehmen beim Eintrocknen oft eine grau- bis schwarzblaue oder blaugrüne Farbe an, die, wie die mikroskopische Betrachtung lehrt, auf die Bildung von Indigblau zurückzuführen ist.

Auch ist seit Langem bekannt, dass die Blüthen von *Calanthe* und *Phajus* beim Erfrieren Indigblau bilden und sich dabei blau färben.[1]

Gleiches muss auch in unserem Versuche angenommen werden, denn der Alkohol als solcher hat nicht in merklichem Grade die Fähigkeit, Indican in Indigblau überzuführen. Eine aus indicanreichen Blättern bereitete Indicanlösung kann mit beliebigen Mengen von Alkohol versetzt werden, ohne dass eine

---

[1] Vergl. die diesbezügliche Literatur bei Pfeffer, Pflanzenphysiologie, II, S. 436.

merkliche Spaltung erfolgt, während der Zusatz von Ammoniak oder Salzsäure rasch eine Abscheidung von Indigblau hervorruft.

In der lebenden normal functionirenden Zelle bildet sich nie Indigblau, es muss also das Indican hier von jenen Substanzen, die seine Spaltung in der todten oder absterbenden Zelle herbeiführen, räumlich getrennt sein. Erinnern wir uns ferner, dass das Protoplasma im lebenden Zustande für gewisse Substanzen des Zellsaftes äusserst schwer permeabel ist, so wird unter der Voraussetzung, dass das Indican sich im Plasma vorfindet, das Entstehen von Indigblau in der Zelle leicht erklärlich: Der in die Zelle eindringende Alkoholdampf tödtet das Plasma, macht dasselbe dadurch für den Zellsaft und die darin gelösten Substanzen sofort leicht durchlässig und ermöglicht so das Aneinanderprallen der früher von einander getrennten Substanzen. Welcher Natur letztere sind, lässt sich bei dem Umstande, dass wir vorläufig gar nicht wissen, ob das Indican im Plasma oder im Zellsaft vorkommt, mit Sicherheit nicht aussagen. Es könnten innerhalb der Zelle sowohl alkalische, als auch saure Substanzen die Spaltung besorgen, doch dürfte wahrscheinlich den letzteren in den meisten Fällen diese Rolle zufallen.

III. Über die Vertheilung des Indicans in den Indigopflanzen.

Mit Hilfe der eben geschilderten Methode gelingt es leicht, sich über die Vertheilung des Indicans innerhalb der Pflanze ein Bild zu verschaffen. Ich beginne gleich mit einer leicht beschaffbaren Indigopflanze, mit dem Waid

Isatis tinctoria L.

Die untersuchten Pflanzen standen theils im freien Lande, theils in Blumentöpfen. Für den makroskopischen Nachweis empfiehlt sich am besten verdünntes Ammoniak.

Die Wurzel fand ich bei blühenden Exemplaren und bei etwa 14 Tage alten Keimlingen frei von Indican, doch konnte ich bei einen Monat alten Pflanzen und bei solchen, die ich Ende März im freien Lande sammelte, Spuren des Glykosids nachweisen.

Der Stengel führt nur sehr wenig Indican, dieses lässt sich mikroskopisch besonders im Cambium und der Epidermis nachweisen. Im Hypocotyl junger Keimlinge liegt es vornehmlich in der Umgebung des Gefässbündels.

Blatt. Schon die beiden im Lichte ergrünten Keimblätter und die jungen, die Plumula umhüllenden Primordialblätter enthalten sammt dem Vegetationspunkte des Stengels reichlich Indican. Dasselbe lässt sich von den übrigen Laubblättern sagen, wie denn die Laubblätter, zumal die jungen, noch im Wachsthum begriffenen, als die indicanreichsten Theile der Waidpflanze bezeichnet werden müssen. Die Zellen der Epidermis, des Mesophylls und die protoplasmaführenden Elemente der Gefässbündel enthalten zahllose Kryställchen von Indigblau, die letzteren in so grossen Mengen, dass die ganze Nervatur als blaues Netz in Erscheinung tritt.

Blüthe. Im Fruchtknoten reichlich Indican. In den Blumenblättern der Knospe wenig, in denen der geöffneten Blüthe Spuren oder gar keines.

In der reifen Frucht und im reifen Samen fehlt Indican vollständig. Der unter der Fruchtepidermis auftretende schwarzbraune oder schwarzviolette Farbstoff, welcher der Frucht die dunkle Farbe verleiht und öfters für Indigblau gehalten wurde, hat mit diesem Körper nichts zu thun. Er färbt sich mit Ammoniak oder Kalilauge grün, mit Säuren roth, verhält sich also diesen Körpern gegenüber so wie Anthokyan.

Polygonum tinctorium L.

Ich untersuchte blühende, im Freien gezogene Pflanzen und im Topfe wachsende Keimlinge.

Ebenso wie beim Waid entsteht auch hier sehr frühzeitig das Indican. Während es aber bei *Isatis* schon in den Cotylen und im Hypocotyl auftritt, lässt sich das Glykosid beim Färbeknöterich erst in den auf die Keimblätter folgenden Primordialblättern nachweisen.

Keimlinge, die im Ganzen etwa 4—6 Blätter besitzen, lassen nach Ausführung der Alkoholprobe die Vertheilung des Indigoblaues sehr anschaulich erkennen: Wurzel, Hypocotyl und Cotylen sind farblos, die darauf folgenden Blätter blau,

und zwar umso intensiver, je näher sie der Stammspitze liegen. Bei erwachsenen Pflanzen erscheinen nur die Blätter blau.

Durch die mikroskopische Betrachtung kann man sich auch thatsächlich überzeugen, dass die Wurzel, der Stengel, die Ochrea (verwachsene Nebenblätter), der Blattstiel sammt den verholzten Elementen der Blattnervatur, die Blüthe und die Frucht frei von Indican sind. Nur die Epidermis des Laubblattes und das chlorophyllführende Mesophyll führt Indican, die erstere wenig, das letztere viel. Das Assimilationsgewebe stellt somit den Hauptsitz des Glykosids dar.

Zuweilen fand ich im Blatte den Farbstoff in den den Gefässbündeln benachbarten Parenchymzellen angehäuft.

Blätter verlieren beim Vergilben ihr Indican. Solche, die noch stellenweise grün und gelb sind, zeigen dies besonders deutlich: in den grünen Stellen findet sich Indigblau vor, in den gelben keines oder nur Spuren.

Phajus grandiflorus Lour.

Die Thatsache, dass aus dieser Orchidee sich Indigo gewinnen lässt, verdanken wir Clamor-Marquart.[1] Nach diesem Autor liefern sowohl die Blüthenschäfte, als auch die Blätter den Farbstoff, nach Calvert[2] dagegen nur die Stengel und nicht die Blätter. Wir werden gleich sehen, dass das Indican bei dieser Pflanze in allen Organen (Wurzel, Stamm, Blatt und Blüthe) vorhanden ist.

Zuvörderst hebe ich hervor, dass das Indican bei *Phajus* und, wie ich gleich hier bemerken will, auch bei der Orchidee *Calanthe veratrifolia* R. Br. sich viel leichter spalten lässt als beim Waid und beim Färbeknöterich. Schon das Kochen mit reinem Wasser führt hier zum Ziele. Kleine, wenige Quadratcentimeter grosse Blattstücke in der Eprouvette gekocht, färben das Wasser deutlich blaugrün und verleihen demselben deutlich Fluorescenz. Der leichte Zerfall des Glykosids bedingt es, dass hier auch schon beim Eintrocknen der Organe reichlich Indigblau entsteht, was bei chlorophylllosen oder chlorophyllarmen

---

[1] Rochleder, Phytochemie, S. 224.

[2] Rochleder, Phytochemie, S. 224.

Organen direct an der Bläuung wahrzunehmen ist. So an den Blüthen und an Schnittflächen der Scheinknollen. Worin die relativ leichte Entstehung von Indigblau ihren Grund hat, lässt sich derzeit mit Bestimmtheit nicht sagen, doch darf man der Vermuthung Raum geben, dass ein in den Zellen von *Phajus* vorkommender Stoff die Spaltung des Indicans unterstützt oder dass hier ein leichter spaltbares Indican vorkommt als beim Waid.

Wurzel. Die relativ grösste Menge von Indican findet sich in den Meristemzellen der Spitze und in 1—3 Zelllagen knapp unterhalb der Wurzelhülle (Velamen). In den Wurzelhaaren, dem Velamen und dem übrigen Wurzelparenchym sehr wenig, nur Spuren in einzelnen Zellen des centralen Gefässbündelcylinders.

Der Stengel und die knollenförmigen Verdickungen (Scheinknollen) desselben führen reichlich Indican.

Blatt. In der Epidermis wenig, im grünen Parenchym viel, im Gefässbündel nur Spuren des Glykosids.

Blüthe. Alle Theile, und zwar nahezu alle Zellen mit Ausnahme der Pollinarien indicanhältig.

Calanthe veratrifolia.

Im Wesentlichen Alles so wie bei *Phajus*.

Marsdenia tinctoria R. Br.

Untersucht wurden trockene beblätterte Sprosse, die mir aus Java zugesandt wurden. Die Blätter sahen bei ihrer Ankunft grün und blau gefleckt aus. Sie hatten nämlich beim Eintrocknen stellenweise Indigo gebildet und sich infolge dessen hier blau bis blauschwarz verfärbt.

Die Spaltung des Indicans gelang noch mit den trockenen Theilen ausgezeichnet, sowohl mit Wasser allein, als auch mit Ammoniak und Salzsäure.

Blattspreite, Blattstiel und Stengel enthalten sehr viel Indican. Die Spreite vorzugsweise im grünen Mesophyll, der Stengel besonders in der Innenrinde und im Mark

Indigofera.

Bekanntlich wird die Hauptmenge des im Welthandel vorkommenden Indigos aus verschiedenen Arten der Gattung *Indigofera* gewonnen.[1] Sie ist die Indigopflanze par excellence, und desshalb habe ich ihr ganz besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Aus den botanischen Gärten von Graz, Wien und Prag standen mir folgende Arten in frischen Zweigen zur Verfügung:[2] *Indigofera Dosua* Ham., *I. argentea* L., *I. chinensis* und *I. decora*. Ich konnte jedoch bei keiner dieser Arten weder mittelst meiner Methoden, noch mit den bekannten chemischen, noch mittelst Gährung irgend eine Spur von Indigblau abscheiden. Sie enthielten also bestimmt kein Indican. Ob gerade diese Arten in den Tropen Indican ausbilden, ist mir nicht bekannt, es wäre aber nicht unmöglich, dass sie in den Tropen sich anders verhalten als bei uns, da ja der Chemismus der Pflanze durch Klima und Standort sicherlich in einzelnen Punkten beeinflusst werden kann.[3]

Da mir sehr viel daran lag, die Sicherheit meiner Methoden auch an *Indigofera* zu erproben, bat ich den Director des botanischen Gartens in Buitenzorg auf Java, Herrn Prof. Treub, *Indigofera*-Arten, welche nachweislich Indigo liefern, mittelst

---

[1] Wiesner J., Die Rohstoffe des Pflanzenreiches. Leipzig 1873, S. 660. Vergl. ferner Georgievics v., Der Indigo vom praktischen und theoretischen Standpunkte. Leipzig und Wien 1892, S. 5.

[2] Die Pflanzen aus den beiden zuletzt genannten Gärten verdanke ich der Güte des Herrn Prof. Dr. R. v. Wettstein.

[3] Hiefür sprechen unter Anderem auch folgende Bemerkungen Darwin's: »Die chemischen Eigenschaften, Gerüche und Gewebe der Pflanzen werden oft durch eine uns unbedeutend scheinende Veränderung modificirt. Der Schierling soll in Schottland kein Coniin enthalten, die Wurzel des *Aconitum Napellus* wird in kalten Klimaten unschädlich, die arzneilichen Eigenschaften der *Digitalis* werden durch Cultur leicht afficirt, der Rhabarber gedeiht in England, aber producirt nicht jene Arzneisubstanz, welche die Pflanze in der chinesischen Tartarei so werthvoll macht. Da die *Pistacia Lentiscus* so reichlich im Süden von Frankreich wächst, so muss das Klima ihr zusagen; sie ergibt aber keinen Mastix. Der *Laurus Sassafras* verliert in Europa den ihm in Nordamerika eigenen Geruch.« Das Variiren der Thiere und Pflanzen etc. Deutsche Übersetzung von Carus. Stuttgart 1868, II. Bd., S. 363.

Organen direct an der Bläuung wahrzunehmen ist. So an den Blüthen und an Schnittflächen der Scheinknollen. Worin die relativ leichte Entstehung von Indigblau ihren Grund hat, lässt sich derzeit mit Bestimmtheit nicht sagen, doch darf man der Vermuthung Raum geben, dass ein in den Zellen von *Phajus* vorkommender Stoff die Spaltung des Indicans unterstützt oder dass hier ein leichter spaltbares Indican vorkommt als beim Waid.

Wurzel. Die relativ grösste Menge von Indican findet sich in den Meristemzellen der Spitze und in 1—3 Zelllagen knapp unterhalb der Wurzelhülle (Velamen). In den Wurzelhaaren, dem Velamen und dem übrigen Wurzelparenchym sehr wenig, nur Spuren in einzelnen Zellen des centralen Gefässbündelcylinders.

Der Stengel und die knollenförmigen Verdickungen (Scheinknollen) desselben führen reichlich Indican.

Blatt. In der Epidermis wenig, im grünen Parenchym viel, im Gefässbündel nur Spuren des Glykosids.

Blüthe. Alle Theile, und zwar nahezu alle Zellen mit Ausnahme der Pollinarien indicanhältig.

Calanthe veratrifolia.

Im Wesentlichen Alles so wie bei *Phajus*.

Marsdenia tinctoria R. Br.

Untersucht wurden trockene beblätterte Sprosse, die mir aus Java zugesandt wurden. Die Blätter sahen bei ihrer Ankunft grün und blau gefleckt aus. Sie hatten nämlich beim Eintrocknen stellenweise Indigo gebildet und sich infolge dessen hier blau bis blauschwarz verfärbt.

Die Spaltung des Indicans gelang noch mit den trockenen Theilen ausgezeichnet, sowohl mit Wasser allein, als auch mit Ammoniak und Salzsäure.

Blattspreite, Blattstiel und Stengel enthalten sehr viel Indican. Die Spreite vorzugsweise im grünen Mesophyll, der Stengel besonders in der Innenrinde und im Mark

Indigofera.

Bekanntlich wird die Hauptmenge des im Welthandel vorkommenden Indigos aus verschiedenen Arten der Gattung *Indigofera* gewonnen.[1] Sie ist die Indigopflanze par excellence, und desshalb habe ich ihr ganz besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Aus den botanischen Gärten von Graz, Wien und Prag standen mir folgende Arten in frischen Zweigen zur Verfügung:[2] *Indigofera Dosua* Ham., *I. argentea* L., *I. chinensis* und *I. decora*. Ich konnte jedoch bei keiner dieser Arten weder mittelst meiner Methoden, noch mit den bekannten chemischen, noch mittelst Gährung irgend eine Spur von Indigblau abscheiden. Sie enthielten also bestimmt kein Indican. Ob gerade diese Arten in den Tropen Indican ausbilden, ist mir nicht bekannt, es wäre aber nicht unmöglich, dass sie in den Tropen sich anders verhalten als bei uns, da ja der Chemismus der Pflanze durch Klima und Standort sicherlich in einzelnen Punkten beeinflusst werden kann.[3]

Da mir sehr viel daran lag, die Sicherheit meiner Methoden auch an *Indigofera* zu erproben, bat ich den Director des botanischen Gartens in Buitenzorg auf Java, Herrn Prof. Treub, *Indigofera*-Arten, welche nachweislich Indigo liefern, mittelst

---

[1] Wiesner J., Die Rohstoffe des Pflanzenreiches. Leipzig 1873, S. 660. Vergl. ferner Georgievics v., Der Indigo vom praktischen und theoretischen Standpunkte. Leipzig und Wien 1892, S. 5.

[2] Die Pflanzen aus den beiden zuletzt genannten Gärten verdanke ich der Güte des Herrn Prof. Dr. R. v. Wettstein.

[3] Hiefür sprechen unter Anderem auch folgende Bemerkungen Darwin's: »Die chemischen Eigenschaften, Gerüche und Gewebe der Pflanzen werden oft durch eine uns unbedeutend scheinende Veränderung modificirt. Der Schierling soll in Schottland kein Coniin enthalten, die Wurzel des *Aconitum Napellus* wird in kalten Klimaten unschädlich, die arzneilichen Eigenschaften der *Digitalis* werden durch Cultur leicht afficirt, der Rhabarber gedeiht in England, aber producirt nicht jene Arzneisubstanz, welche die Pflanze in der chinesischen Tartarei so werthvoll macht. Da die *Pistacia Lentiscus* so reichlich im Süden von Frankreich wächst, so muss das Klima ihr zusagen; sie ergibt aber keinen Mastix. Der *Laurus Sassafras* verliert in Europa den ihm in Nordamerika eigenen Geruch.« Das Variiren der Thiere und Pflanzen etc. Deutsche Übersetzung von Carus. Stuttgart 1868, II. Bd., S. 363.

meines Verfahrens prüfen und mir das Ergebniss der Untersuchung gütigst mittheilen zu lassen. Herr Director Treub, dessen Entgegenkommen in wissenschaftlichen Kreisen rühmlichst bekannt ist, bewog daraufhin Herrn Dr. v. Romburgh, Chef der III. Abtheilung des dortigen botanischen Gartens, die berührten Experimente zu machen, und dieser hatte die besondere Gefälligkeit, nicht nur die gewünschte Untersuchung durchzuführen, sondern mich noch überdies mit *Indigofera*-Material aus den Tropen zu versehen.[1]

Herr Dr. v. Romburgh übersandte mir Blätter, Stengel, Wurzeln und Früchte von folgenden, sämmtlich im dortigen Culturgarten gezogenen Arten:

Indigofera Anil L.

Indigofera leptostachya DC.

Guatemala-Indigo, sehr wahrscheinlich *Indigofera disperma.*

Indigo aus Centralamerika, sehr wahrscheinlich *Indigofera tinctoria* L. (oder Spielarten).

Natal-Indigo *(Indigofera leptostachya?).*

Indigofera hirsuta L. und *Indigofera galegoides* DC., beide aus dem botanischen Garten zu Buitenzorg.

Über die Ergebnisse der Untersuchung schreibt mir Herr Dr. v. Romburgh wörtlich: »Mit Ausnahme der beiden letzteren *(I. hirsuta* und *galegoides)* färben die Blätter, wenn sie im frischen Zustande mit verdünnter Salzsäure und Luft und nachher mit Chloroform geschüttelt werden, die Chloroformschichte schön blau. Die Reaction gelingt auch sehr gut, wenn man an Stelle der Salzsäure Ammoniak nimmt, und selbst auch ohne diese Reagentien, freilich aber weniger schön. Trocknet man die Blätter an der Luft, so verwandelt sich ihre rein grüne Farbe in eine schmutzige, und statt der blauen Chloroformschichte erhält man mit obigen Reagentien eine rothviolette. Ich habe mir einige Mühe gegeben, die Blätter derart zu trocknen und aufzubewahren, dass sie auch nach längerer Zeit noch die

---

[1] Beiden Herren bin ich für ihre Mühewaltung zu grösstem Danke verpflichtet.

gewünschte Reaction zeigen..... Wenn man die Blätter über ungelöschten Kalk trocknet und aufbewahrt, geben sie noch nach einigen Monaten die Reaction in ausgezeichneter Schönheit. *Indigofera hirsuta* und *I. galegoides* geben die Reaction nicht. Zwar habe ich einmal mit einem wässerigen Auszug von *I. hirsuta*, den ich mit ein wenig Ammoniak der Luft aussetzte, eine Spur eines blauen Niederschlages bekommen, konnte aber wegen mangelnden Materiales den Versuch nicht wiederholen.

Legt man die Blätter von Guatemala-Indigo in Wasser, so erhält man nach einigen Stunden eine sherryfarbige, schön grün fluorescirende Flüssigkeit, die an der Luft bald eine Schicht Indigo an der Oberfläche gibt, indem die Farbe der Flüssigkeit roth wird. Mit *I. hirsuta* und *I. galegoides* ist dies nicht der Fall, der Auszug ist nur etwas bräunlichgelb gefärbt.«

An die vorstehenden interessanten Mittheilungen mögen als Ergänzung meine eigenen Beobachtungen gereiht werden, die ich an dem übersandten trockenen Material anstellte.[1]

Im Wesentlichen erhielt ich noch an diesem dieselben Resultate wie Herr Dr. v. Romburgh. Es liess sich mit verdünnter Salzsäure in den Blättern jener Arten, welche sich in Java als indicanhältig erwiesen, Indigblau mit Leichtigkeit abscheiden. Das Chloroform färbte sich in der Regel blau oder rothviolett. Mit Wasser oder Ammoniak gekocht gaben die Blätter die Reaction nicht mehr. Im Folgenden mögen noch einige specielle Angaben Platz finden.

Indigofera Anil L. Die Blätter enthalten reichlich Indican, und zwar sowohl in der Epidermis, als auch im Mesophyll. In der Wurzel, dem Stengel, den Früchten und Samen konnte ich kein Indican nachweisen.

Indigofera leptostachya DC. Wesentlich Alles so wie bei *I. Anil*.

Indigofera sp. aus Guatemala. Wie vorher. Die Blätter geben nach 1—2tägigem Aufenthalt im Wasser einen Boden-

---

[1] Dasselbe gelangte in verlötheten Blechkisten, in welchen sich neben den Pflanzen zur Absorption der Feuchtigkeit ungelöschter Kalk befand, in trockenem Zustande nach etwa dreimonatlicher Reise in meine Hände.

satz von Indigo, und an der Oberfläche der Flüssigkeit bildet sich eine kupferig schillernde Haut desselben Stoffes.[1]

Indigofera sp. von Natal und *I.* sp. aus Centralamerika verhalten sich ebenso wie *I. leptostachya* DC.

Indigofera hirsuta L. und *I. galegoides* DC. enthielten kein Indican.

Nachdem wir nun das Vorkommen und die Vertheilung des Indicans in den uns zugänglichen Indigopflanzen untersucht, wollen wir uns die wichtigsten Resultate in einer Tabelle übersichtlich zusammenstellen.

Name der Pflanze	Indican-Gehalt					
	Wurzel	Stengel	Blatt	Blüthe	Reife Frucht	Same
Isatis tinctoria	Spuren oder 0	wenig	viel	Wenig, im Fruchtknoten viel	0	0
Polygonum tinctorium	0	0	sehr viel	0	0	0
Phajus grandiflorus	wenig	viel	sehr viel	viel	?	?
Calanthe veratrifolia	wenig	viel	viel	viel	?	?
Marsdenia tinctoria	?	viel	sehr viel	sehr viel	?	?
Indigofera Anil	0	0	sehr viel	?	0	0
Indigofera leptostachya	0	0	sehr viel	?	0	0
Indigofera hirsuta	0	0	0	0	0	0
Indigofera galegoides	0	0	0	0	0	0

[1] Nach E. Alvarez soll das durch Wasser aus *Indigofera*-Blättern ausziehbare farblose Chromogen durch einen eigenen Spaltpilz in Indigblau übergeführt werden und diesem bei dem Gährungsprocesse, welchem die Indigopflanzen unterworfen werden, eine hervorragende Rolle zukommen. Wässerige sterilisirte Extracte behalten nach Alvarez monatelang ihre röthliche Färbung, während nach Zusatz der erwähnten Bacterien schon nach einigen Stunden reichliche Indigobildung eintritt. Sur un nouveau microbe, déterminant la fermentation indigotique et la production de l'indigo bleu. Comptes rendus, 105 (1887), p. 286.

Von Vorneherein ist es nicht unwahrscheinlich, dass Bacterien bei der Darstellung des Indigos im Grossen betheiligt sind. Sie könnten ja schon einfach durch Production von Säuren spaltend auf das Indican einwirken.

Aus dieser Zusammenstellung, sowie aus den speciellen Untersuchungen ergibt sich, dass — soweit unsere Erfahrungen reichen — abgesehen von Same und Frucht das Indican zwar in verschiedenen, aber für jede Art bestimmten Organen auftritt und dass sich die Hauptmenge desselben in den grünen Laubblättern vorfindet. Unter diesen sind die jungen, noch in Entfaltung begriffenen jedenfalls reicher an dem Glykosid als die bereits ausgewachsenen, wie denn überhaupt in Entwicklung begriffene Gewebe (Wurzelspitzen, Laubknospen) einen grösseren Reichthum von Indican gegenüber den fertig ausgebildeten Geweben bekunden.

IV. Über angebliche Indigopflanzen.

Es wäre gewiss von Interesse, auch die anderen bekannten Indigopflanzen nach den hier angegebenen Methoden auf ihren Indicangehalt zu prüfen. Leider blieben meine Bemühungen, diese Pflanzen aus den botanischen Gärten Europas zu erhalten, erfolglos, wesshalb ich meine Untersuchungen bloss auf die sechs Gattungen beschränken musste: *Isatis*, *Polygonum*, *Phajus*, *Calanthe*, *Marsdenia* und *Indigofera*.

Zu jenen Gewächsen, welche mehrfachen Angaben zufolge sicher Indigo liefern sollen, gehören noch:[1] *Galega tinctoria* L., *Marsdenia parviflora* Decais., *Nerium tinctorium* L., *Asclepias tinctoria* Roxbg. (?), *Asclepias tingens* Roxbg. und *Spilanthes tinctorius* Lour.

Es dürfte also rund zehn Indigo liefernde phanerogame Gattungen geben, welche den verschiedensten, im Systeme weit auseinander stehenden Pflanzenfamilien angehören.

Überdies werden immer und immer wieder einige Pflanzen angeführt, welche angeblich Indigofarbstoff oder einen damit sehr ähnlichen liefern sollen.[2] Hiezu gehören: *Mercurialis perennis!*, *Melampyrum arvense!* und *cristatum!*, *Polygonum Fagopyrum!*, *Polygala bracteolata*, *Croton tinctorium* und *verbascifolium*, *Phytolacca decandra!* und *mexicana*, *Monotropa*

---

[1] Wiesner, l. c. und Rochleder, Phytochemie.

[2] Husemann und Hilger, Die Pflanzenstoffe, 2. Aufl., II. Bd., S. 1079, ferner v. Georgievics, l. c. S. 7—8.

Hypopytis!, *Fraxinus excelsior!*, *Coronilla Emerus!*, *Amorpha fruticosa!* und andere.

Davon habe ich die mit einem ! versehenen untersucht, aber aus keiner einzigen in irgend einer Weise eine Spur Indigblau gewinnen können.

Von *Mercurialis perennis* und *M. annua*, besonders aber von der ersteren Art, ist es bekannt, dass sie beim Eintrocknen zumal an der Basis des Stengels stahlblau wird. Dieser vorzugsweise im Rinden-Collenchym sitzende Farbstoff stimmt in seinen Eigenschaften gar nicht mit Indigblau überein, ich will nur erwähnen, dass er sich im Wasser löst und mit Säuren, z. B. mit verdünnter Salzsäure, roth wird.

Bezüglich *Melampyrum* und *Monotropa* vergleiche man das letzte Capitel (V.) dieser Abhandlung.

V. Über den Einfluss des Lichtes auf die Bildung von Indican bei Isatis tinctoria L.

Verschiedene Beobachtungen, die ich gelegentlich an Waidpflanzen machte, regten mich zu Versuchen über das oben bezeichnete Thema an.

Wenn man *Isatis*-Samen in Blumentöpfe säet und diese theils im Sonnenlichte, theils in totaler Finsterniss aufstellt, so kann man sich leicht überzeugen, dass nur die Lichtkeimlinge Indican bilden, die Finsterkeimlinge aber auch nicht in Spuren. Werden etwa 14 Tage alte Keimlinge, welche während des Tages durch mehrere Stunden directes Sonnenlicht genossen und reichlich Indican gebildet hatten, 2—3 Wochen finster gestellt, so verschwindet das Indican vollends.

Diese Thatsachen scheinen mir in theoretischer und praktischer Beziehung beachtenswerth, in theoretischer, weil hier das erste sicher constatirte Beispiel für den Fall vorliegt, dass ein gut charakterisirtes Glykosid einer Pflanze nur im Lichte entsteht, in praktischer, weil möglicherweise auch bei anderen Indigopflanzen die Muttersubstanz des Indigblaues in ihrer Entstehung von der Beleuchtung abhängig ist und es mithin nicht gleichgiltig sein wird, ob die betreffenden Gewächse auf sonnigem oder schattigem Standort gezogen und ob dieselben Morgens oder Abends geerntet werden.

VI. Über ein neues Chromogen der Pflanze.

Die Schuppenwurz *Lathraea Squamaria* L. besitzt bekanntlich im frischen Zustande an dem unterirdischen Wurzelstock eine weissliche, an den oberirdischen Organen eine mehr minder rosenrothe Farbe, welch' letztere von Anthokyan herrührt. Es ist ferner bekannt, dass diese Pflanze beim Eintrocknen in der Luft oder im Herbar eine schwärzliche Farbe annimmt.

H. de Vries[1] hat vor nicht langer Zeit ein Verfahren angegeben, wodurch es gelingt, Pflanzen, welche die oben angedeutete, dem Pflanzensammler höchst unangenehme Verfärbung aufweisen, im Spiritus in farblosem Zustande zu erhalten. Man hat nur zu diesem Zwecke dem Weingeist zwei Volumprocente Salzsäure hinzuzufügen.

Als ich im vorigen Jahre behufs hübscher Conservirung einer *Lathraea* das Verfahren von de Vries anwenden wollte, machte ich eine nicht uninteressante Beobachtung. Die Schuppenwurz färbte sich zuerst in allen jenen Theilen, welche ursprünglich rosaroth waren, infolge ihres Anthokyangehaltes intensiv roth. Doch dies war selbstverständlich und nicht auffallend. Was mich aber in hohem Grade überraschte, war der Umstand, dass am nächsten Tage die Flüssigkeit tief blau gefärbt war mit einem Stich ins Violette. Diese Färbung konnte natürlich nicht von Anthokyan herrühren, da die Flüssigkeit relativ viel Salzsäure enthielt und sehr stark sauer reagirte. Anthokyan hätte unter den gegebenen Verhältnissen roth erscheinen müssen. Nach und nach scheidet sich der blaue Farbstoff, wie man sich leicht unterm Mikroskop überzeugen kann, in Form von Häutchen oder Körnchen ab, die zu unregelmässigen oder dendritischen Flocken zusammentreten.

Man kann sich leicht überzeugen, dass derselbe Versuch mit der *Lathraea* auch in 1—2% Salzsäure gelingt und dass somit der Alkohol bei der Entstehung des blauen Farbstoffes bedeutungslos ist.

Ich konnte dann weiters durch Versuche feststellen, dass man den Farbstoff aus der frischen Schuppenwurz fast augen-

---

[1] Eine Methode zur Herstellung farbloser Spirituspräparate. Berichte der deutschen botan. Gesellsch., 1889, S. 298.

cirt wird, hingegen nicht immer von allen Arten derselben Gattung (*Indigofera, Polygonum* etc.).

2. Durch folgendes Verfahren kann rasch entschieden werden, ob eine Pflanze oder ein Pflanzentheil Indican enthält oder nicht. Man kocht etwa $^1/_2$ Minute Fragmente der Pflanze in der Eprouvette mit verdünntem Ammoniak (98 cm^3 H_2O und 2 cm^3 käufl. Ammoniak), filtrirt über einen Platinconus und schüttelt nach dem Abkühlen mit wenig Chloroform aus. Denselben Versuch vollführt man anstatt mit Ammoniak mit zweiprocentiger Salzsäure. Enthält die Pflanzenprobe Indican, so färbt sich bei einem der beiden oder bei beiden Versuchen die Chloroformschichte blau oder violett, weil das beim Kochen abgespaltene Indigblau vom Chloroform leicht aufgenommen wird.

3. Der Umstand, dass das Indican bei gewissen Pflanzenarten durch Ammoniak gespalten wird, bei anderen, z. B. beim Färbeknöterich nicht, spricht dafür, dass das Indican nicht in allen Indigopflanzen identisch sein dürfte.

4. Für den mikrochemischen Nachweis fand ich folgendes Verfahren sehr geeignet:

Die lebenden Pflanzentheile werden auf etwa 24 Stunden in Alkoholdampf eingelegt, dann behufs Ausziehung des Chlorophylls in flüssigen Alkohol (absol.) gebracht und schliesslich nach passender Zurichtung für das Mikroskop in concentrirtem Chloralhydrat betrachtet.

Abgesehen davon, dass bei dieser Methode das Indican innerhalb der Zellen, also an seinem ursprünglichen Orte in Indigblau übergeführt und hier in zahllosen Körnchen und Kryställchen von Indigblau erkennbar wird, gewährt diese »Alkoholprobe« überdies auch dem unbewaffneten Auge einen Einblick in die Vertheilung des Glykosids und leistet für den Indican-Nachweis Analoges wie die bekannte Sachs'sche »Jodprobe« für den Stärkenachweis.

5. Das Indican kann bei den verschiedenen Indigopflanzen in verschiedenen Organen und Geweben auftreten, doch liegt die Hauptmasse desselben wohl in der Regel in den Laubblättern, zumal in den jungen, sich noch entfaltenden. Innerhalb des Laubblattes findet sich das Glykosid gewöhnlich im chloro-

phyllführenden Mesophyll und in der Oberhaut. Die Wurzel enthält wenig oder kein Indican, Same und Frucht sind bei den untersuchten Arten frei davon.

6. In der lebenden Zelle kommt niemals Indigblau vor. Diese Thatsache muss jedenfalls als eine sehr merkwürdige bezeichnet werden, besonders wenn man bedenkt, dass im Zellinhalt Stoffe vorkommen, welche das Indican spalten könnten, und ferner, dass das Indican in vergilbenden Blättern oder in verdunkelten Keimpflanzen des Waids thatsächlich Wandlungen erleidet und als solches verschwindet.

7. Das Indican entsteht in der Keimpflanze des Waids nur im Lichte.

8. Die in der Literatur immer wieder auftretende Behauptung, dass *Mercurialis perennis*, *Melampyrum arvense*, *Polygonum Fagopyrum*, *Phytolacca decandra*, *Monotropa Hypopitys*, *Fraxinus excelsior*, *Coronilla Emerus* und *Amorpha fruticosa* Indican enthalten, ist unrichtig.

9. In den Organen der frischen Schuppenwurz *Lathraea Squamaria* kommt ein Chromogen vor, welches mit verdünnter Salzsäure einen blauen Farbstoff liefert, der aber von Indigo ganz verschieden ist. Einen vielleicht damit verwandten, wenn nicht denselben Farbstoff liefern bei gleicher Behandlung im frischen Zustande *Rhinanthus crista galli*, *Melampyrum nemorosum*, *M. silvaticum*, *Bartsia alpina*, *Euphrasia officinalis*, *Utricularia vulgaris*, *Galium Mollugo* und *Monotropa Hypopytis*.

Inhaltsübersicht.

Seite

I. Einleitung 269
II. Methodisches 270
a) Makrochemischer Nachweis des Indicans 270
b) Mikrochemischer Nachweis des Indicans 272
III. Die Vertheilung des Indicans in den Indigopflanzen 275
Isatis tinctoria 275
Polygonum tinctorium 276
Phajus grandiflorus 277
Calanthe veratrifolia 278
Marsdenia tinctoria 278
Indigofera-Arten 279
IV. Über angebliche Indigopflanzen 283
V. Über den Einfluss des Lichtes auf die Bildung von Indican bei *Isatis tinctoria* L. 284
VI. Über ein neues Chromogen der Pflanze 285
VII. Zusammenfassung der wichtigeren Resultate 287